



**UNIVERSIDAD DE CHILE**

FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS Y PECUARIAS  
ESCUELA DE CIENCIAS VETERINARIAS

DETECCIÓN DE *Salmonella enterica* en AVES SILVESTRES  
ACUÁTICAS E IDENTIFICACIÓN DE GENES ASOCIADOS A  
VIRULENCIA.

**MARÍA VIOLETA BARRERA NAVARRO**

Memoria para optar al Título  
Profesional de Médico Veterinario  
Departamento de Medicina  
Preventiva Animal

PROFESOR GUÍA: PATRICIO RETAMAL  
Proyecto Fondecyt 11110398

SANTIAGO, CHILE  
2013



# UNIVERSIDAD DE CHILE

FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS Y PECUARIAS  
ESCUELA DE CIENCIAS VETERINARIAS

## DETECCIÓN DE *Salmonella enterica* en AVES SILVESTRES ACUÁTICAS E IDENTIFICACIÓN DE GENES ASOCIADOS A VIRULENCIA.

### MARÍA VIOLETA BARRERA NAVARRO

Memoria para optar al Título  
Profesional de Médico Veterinario  
Departamento de Medicina  
Preventiva Animal

NOTA FINAL: .....

	NOTA	FIRMA
PROFESOR GUÍA : PATRICIO RETAMAL	.....	.....
PROFESOR CONSEJERO: LISETTE LAPIERRE	.....	.....
PROFESOR CONSEJERO: PEDRO ABALOS	.....	.....

SANTIAGO, CHILE  
2013

MEMORIA DE TÍTULO

**“DETECCIÓN DE *Salmonella enterica* EN AVES SILVESTRES ACUÁTICAS E IDENTIFICACIÓN DE GENES ASOCIADOS A VIRULENCIA.**

**“DETECTION OF *Salmonella enterica* FROM WATERFOWL AND IDENTIFICATION OF VIRULENCE GENES.**

**María Violeta Barrera Navarro \***

\*Departamento de Medicina Preventiva Animal, Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias, Universidad de Chile, Santiago, Chile.

**Financiamiento**

Este trabajo ha sido financiado por el Proyecto FONDECYT N°11110398

## AGRADECIMIENTOS Y DEDICATORIA

En primer lugar quisiera agradecerle a Dios, quién se ha manifestado en los momentos precisos y me ha ayudado a comprender mejor los desafíos de la Vida.

Inicié un sueño hace años, cuando sentía que quería aprender de los animales y así, vivir más conciente e intensamente. Alejarme de mi familia y amigos de Curicó, ha tenido sus sacrificios, pero el camino ha sido bendecido por el encuentro con muchos otros seres luminosos, de los cuales aprendí y sigo aprendiendo.

Mi fuente de apoyo y consejo constante son mis padres, quiénes con su sabiduría y amor inmenso me han acompañado en todo este tiempo. Así también, mi hermano Esteban, unidos en alma, le agradezco con el corazón por cada discusión, risas y aprendizaje continuo.

A mi compañero de vida, con el cual he tropezado y vuelto a levantarme, pues ha permanecido de pie junto a mí, aún en esos momentos en que la confianza en mi misma se desvanecía. Las palabras no me alcanzan para agradecerte, a ti Eric y a toda tu familia. Gracias infinitas a mi querida tía Carmen, Kelly y sus hijos: mi niño-sol Pablo, mi niña-revolución Matilda y mi niña-esperanza Almendra.

A mis amigos de todas partes, con los cuales hemos compartido momentos inolvidables: Andrea y Gonzalo, Rodrigo, Felipe, Antonieta, Natalia, Carolina, Sofia y Fernanda. A toda mi familia en Curicó, primos, tíos, a mi abuelita, gracias por sus oraciones y su preocupación permanente.

A mi profesor guía Patricio Retamal, por su interminable paciencia, y entusiasmo por el estudio en fauna silvestre. ¡¡Gracias por motivar a los estudiantes de FAVET para que aportemos en la Conservación de nuestras aves!!

Y a la Naturaleza en todas sus formas y colores, gracias por acogerme y dejar que transite por tus caminos, conozca tus bosques, escale tus montañas, admire tus mares. Ayúdame a no desfallecer en el intento por proteger lo que nos da vida y que estamos destruyendo por nuestra terrible inconsciencia. Le das plenitud a mi existencia.

¡A seguir paso a paso, con alegría, confianza, fé, sin miedo!

“Gracias a la Vida, que me ha dado tanto” (Violeta Parra)

“Canto que ha sido valiente, siempre será canción nueva” (Víctor Jara)

“El camino no se acaba, continuaré sin descanso...si logró llegar hasta el punto final, donde no hay más por andar...y desde ahí me acordaré de ti”.

## RESUMEN

*Salmonella enterica* es considerada una de las principales causas de enfermedades transmitidas por los alimentos alrededor del mundo, teniendo un amplio rango de hospederos incluyendo los animales silvestres, lo cual ha generado un esfuerzo constante en la vigilancia epidemiológica de la enfermedad. Sin embargo, las aves silvestres presentan un riesgo mayor, ya que pueden recorrer largas distancias, incluso entre países. En este estudio se aisló *S. enterica* en un 4,95% (46/928) mediante tórula de arrastre, desde aves silvestres acuáticas, principalmente la Gaviota Dominicana (*Larus dominicanus*), en ocho sitios de muestreo a lo largo del país. Los serovares identificados fueron: *S. Enteritidis* con un 69,56% (32/46), *S. Heildeberg* 8,69% (4/46), *S. Seftenberg* 4,34% (2/46) y por último, otros serovares en menores proporciones como *S. Anatum*, *Havana*, *Agona*, *Infantis*, *Dublin*, y una cepa Grupo B (I 4, 5, 12:b:), en donde cada uno presentó una frecuencia de 2,17% (1/46). Además, fueron detectados doce combinaciones de genes asociados a virulencia (virulotipos). Estos resultados sugieren que en Chile, la infección por *Salmonella enterica* en aves silvestres acuáticas podría tener impacto en la salud pública y animal.

Palabras clave: *Salmonella enterica*, Aves silvestres acuáticas, Chile, Virulotipos.

## ABSTRACT

*Salmonella enterica* is considered one of the main causes of food-borne diseases around the world, having a wide host range including domestic and wild animals, which has generated a constant effort in epidemiological surveillance of the disease. However, wild birds have a higher risk because they can move long distances even among countries. In this study, *S. enterica* was isolated in 4,95% (46/928) by drag swab from waterfowls, mostly Dominican Gull (*Larus dominicanus*). The samples were obtained from eight sites throughout the country, identifying the following serovars: *S. Enteritidis* with 69,56% (32/46), *S. Heildeberg* 8,69% (4/46), *S. Seftenberg* 4,34% (2/46) and finally, other serovars in smaller proportions as *S. Anatum*, *Havana*, *Agona*, *Infantis*, *Dublin*, and Group B strain (I 4, 5, 12: b :), wherein each serovar presented a frequency of 2,17% (1/46). In the other hand, we detected twelve combinations of virulence-associated genes (virulotypes). These results suggest that in Chile, *Salmonella enterica* infection in waterfowl could have impacts in public and animal health.

Key Words: *Salmonella enteric*, Waterfowl, Chile, Virulotypes.

## INTRODUCCION

Actualmente los ambientes naturales y urbanos no se encuentran totalmente separados unos de otros, como sí ocurriría décadas atrás. Oportunidades de contacto entre especies silvestres, animales domésticos y el ser humano, son cada vez más comunes, existiendo un riesgo real y casi continuo de transmisión de patógenos.

En el caso específico de las aves silvestres, éstas han sido materia de estudio alrededor del mundo y existe evidencia sustancial de que pueden llegar a ser reservorios de una gran cantidad y diversidad de microorganismos (tanto patógenos como comensales) y que al recorrer enormes distancias, éstos pueden ser transmitidos a otros animales y a los seres humanos (Hubálek, 2004; Kobayashi *et al.*, 2007; Tsiodras *et al.*, 2008). Este es el caso de las aves migratorias que se desplazan miles de kilómetros desde sus lugares de nidificación en el Hemisferio Norte, para alimentarse en latitudes con mejores condiciones climáticas durante el verano austral, como lo es Chile. A lo largo de toda la costa del Pacífico, estas aves establecen contacto con la avifauna nativa, por lo que podrían ingresar al país diversos patógenos, muchos de ellos emergentes y potencialmente zoonóticos.

Con respecto a la presencia de *Salmonella enterica* en aves silvestres, existen múltiples estudios que han descrito un amplio rango de serotipos aislados desde diversas especies de aves (Frere *et al.*, 2000; Duarte *et al.*, 2002; Hubálek, 2004; Nesse *et al.*, 2005; Palmgren *et al.*, 2006; Kobayashi *et al.*, 2007; Dhama *et al.*, 2008; Hughes *et al.*, 2008; Dolejská *et al.*, 2009; López-Martin *et al.*, 2011).

La salmonelosis en tanto, es uno de los mayores problemas de salud pública alrededor del mundo (Pui *et al.*, 2011; Monack, 2012). Con respecto a *S. enterica*, es comúnmente adquirida desde alimentos contaminados y es una causa frecuente de gastroenteritis y bacteremia en personas a nivel mundial (Hendriksen *et al.*, 2011). Se han estimado en 93,8 millones, los casos de gastroenteritis asociados a *Salmonella* que ocurren cada año alrededor del mundo, dentro de las enfermedades transmitidas por los alimentos; lo cual corresponde a un 86% de los casos humanos de salmonelosis (Majowicz *et al.*, 2010 citado por Hoelzer *et al.*, 2011). Lo cual representa un impacto económico negativo, debido al costo en vigilancia, tratamiento y prevención de la enfermedad (Pui *et al.*, 2011).

Actualmente, se han registrado cambios en la prevalencia de cepas específicas y serotipos en humanos y poblaciones animales, relacionados con algunos factores tales como: viajes

internacionales, migración humana, producción de alimentos, forraje para animales y transporte de ganado (Hendriksen *et al.*, 2011).

La situación en Chile también ha cambiado con el transcurso de los años, en el último período de vigilancia de *Salmonella* spp. en pacientes humanos, realizado entre los años 2008-2011, se confirmaron 11,403 cepas provenientes de aislamientos clínicos. El año con el mayor número de casos fue el 2011, demostrando una clara tendencia al alza. Además, se observa una estacionalidad en la presentación de casos, siendo mayor en la temporada primavera-verano (ISP, 2012). En todo el período, las tres serovariedades más frecuentemente aisladas fueron: *Salmonella* Enteritidis (66.1%), *S. Typhimurium* (10.6%) y *S. Typhi* (5.5%), contrastando con la evidencia de casos de salmonelosis en los años 80'-90', en donde *S. Typhi* era el principal foco de atención debido principalmente a las condiciones higiénicas deficientes en esa época. El reservorio natural para *S. typhi* es el ser humano, lo que difiere en absoluto de *S. Enteritidis*, ya que se considera a las aves de corral como su principal reservorio y los productos o subproductos de éstas, las vías de infección para las personas (Fica *et al.*, 2012).

Con respecto al estudio epidemiológico del alcance de *Salmonella* a nivel mundial, es que se ha avanzado actualmente en diversas técnicas moleculares, siendo la tipificación de genes de virulencia (VT, del inglés "Virulotyping") un método determinante al momento de esclarecer qué funciones asociadas a virulencia, están codificadas en cada serotipo actuante en diversas regiones del mundo (Andrews-Polymeris *et al.*, 2009). La aplicación de VT para *Salmonella* está ampliando el conocimiento de cómo los genes asociados a virulencia reflejan propiedades particulares de la bacteria, tales como la especificidad de hospedero y/o zona geográfica y en la virulencia o determinantes de resistencia a antimicrobianos.

Según los resultados de Huehn *et al.*, (2010) en su investigación, la mayoría de los virulotipos descritos para *S. Enteritidis* están restringidos a uno o dos serotipos y no existiría, por ende, diferencias significativas con el hospedero de origen o su ubicación geográfica.

De acuerdo a estos antecedentes, el papel que cumplen las aves silvestres como reservorios de *S. enterica* y el análisis de los virulotipos presentes en estas cepas en nuestro país, requiere ser investigado. El objetivo general de este estudio es, por lo tanto, detectar cepas de *S. enterica* y posteriormente realizar una identificación de genes asociados a virulencia, desde aves silvestres acuáticas en Chile.

## **MATERIALES Y MÉTODOS**

### **Muestreo**

La toma de muestras se llevó a cabo en sitios en donde existía mayor confluencia de aves silvestres acuáticas, fuesen estas migratorias y/o residentes. En la Tabla 3 se especifican los sitios de muestreo.

Las muestras fueron obtenidas de forma indirecta (tórula de heces frescas en ambiente o inmediatamente posterior a la eyección de éstas) y se mantuvieron en medio de transporte Cary Blair (COPAN®) a temperatura de refrigeración, hasta ser procesadas en el laboratorio. La identificación de las especies de aves, fue realizada por avistamiento directo del individuo.

### **Aislamiento e identificación bacteriana**

El procesamiento de las muestras, se llevó a cabo en el Laboratorio de Enfermedades Infecciosas de la Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias de la Universidad de Chile. La duración de esta fase fue alrededor de 3 meses.

### **Protocolo de aislamiento de *Salmonella* desde tómulas.**

Estos procedimientos se basan en las recomendaciones de la Oficina Internacional de Epizootias (OIE), en su “Manual de Test Diagnósticos y Vacunas para los Animales Terrestres” (OIE, 2008) y en recomendaciones específicas para mejorar la sensibilidad del método (Jensen *et al.*, 2003).

#### Día 1

Se realizó un pre-enriquecimiento de la muestra, en un tubo de ensayo con 5 mL de Agua Peptonada Fosfatada (APT) con Novobiocina (20 µg/mL), y se incubó entre 18-24hrs. a 37°C

#### Día 2

Desde aquellos tubos con crecimiento bacteriano (turbidez), se inocularon 2 o 3 gotas (100 µL) en placas de agar Modificado Semisólido Rappaport Vassiliadis (MSRV) con Novobiocina (20 µg/mL), y se incubó por 24 hrs. a 41,5°C.

#### Día 3

Frente a crecimiento sospechoso (crecimiento marcado o con difusión), se realizó una siembra por agotamiento en agar Xilosa Lisina Desoxicolato (XLD) y se incubó por 24 hrs. a 37°C.

#### Día 4

Aquellas colonias sospechosas de *Salmonella* en agar XLD (con precipitado negro o translúcidas), se confirmaron por PCR mediante la detección del gen *invA*, el cual se utiliza por

ser una secuencia conservada de *S. enterica*, y que codifica un componente esencial del aparato de secreción de proteínas asociadas con la invasión. Posteriormente, se realizaron pruebas bioquímicas en los medios Agar Triple Azúcar Hierro (TSI), Agar Hierro Lisina (LIA) y Agar Movilidad Indol Ornitina (MIO), las cuales confirmaron la identidad de las cepas aisladas. Por último, la serotipificación se realizó en el Instituto de Salud Pública (ISP), mediante el esquema de Kauffmann-White.

Para el ensayo de PCR se extrajo el DNA bacteriano a través del “High Pure PCR Template Preparation Kit” ® (Roche), mediante el protocolo descrito por el fabricante.

### **Condiciones específicas para la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)**

Se seleccionaron 8 genes asociados a virulencia cuya presencia ha demostrado ser variable entre aislados de *S. Enteritidis* (Huehn *et al.*, 2010), (Tabla 1). Se realizaron PCR múltiples entre las secuencias *gipA-SEN1417*, *trhH-prot6e*, *invA-pefA-spvC* y un PCR simple para *sirA*. Las concentraciones de cada reactivo, fueron las siguientes: 1x Buffer Taq, 1.6 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.2 mM dNTP's, 0.5 mM de cada partidor, 0.6-0.9 U de Taq Platinum ®, 0.5-1 uL DNA templado en un volumen final de 10-12 uL. Las condiciones de temperatura y ciclos respectivos se detallan en la Tabla 2.

Como control positivo se utilizó DNA extraído desde cepas de *S. Enteritidis*, aisladas previamente en el laboratorio de Enfermedades Infecciosas y evaluadas por las técnicas bioquímicas descritas previamente. Como control de pureza de los reactivos de PCR, se usó H<sub>2</sub>O destilada estéril en lugar de la muestra.

Para la visualización de los amplicones, se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 1.5%, agregando 0.5 µL de tinción GelRed® para la observación de los productos de PCR en un transiluminador UV.

### **Análisis estadístico**

Con los resultados obtenidos, se realizaron análisis de datos categóricos a través de tablas de contingencia, con la ayuda del software INFOSTAST (2010v).

### **Dendograma**

Además, se construyó un árbol filogenético usando el algoritmo “Unweighted Pair Group Method with Averages” (UPGMA), con el software TREECON (1000 repeticiones). El dendograma muestra la similitud genética (%) entre las cepas de *Salmonella enterica*

analizadas mediante PCR. La detección de genes asociados a virulencia (virulotipos), fue representado con cuadrados grises al estar presentes, en tanto las letras indican las frecuencias respectivas (A: 20, B: 10, C: 6, D: 3, E a L: 1). La cepa de colección de referencia de *Salmonella* B 16 (SARB16) fue incluida como control.

## **Bioseguridad**

*S. enterica* está clasificada, como un agente de riesgo intermediario, de acuerdo con el “Manual Estándar de Bioseguridad” generado por CONICYT (2008), el cual contiene medidas correspondientes al Nivel 2 de bioseguridad, en conjunto con una serie de elementos descritos a continuación y que fueron ejecutados y/o utilizados en este trabajo:

- Entrenamiento en la manipulación de muestras y procedimientos experimentales, con énfasis en la bioseguridad.
- Entrenamiento en el uso de elementos de protección personal (delantal blanco, botas, guantes, mascarillas) al momento de la toma de muestras y su manipulación.
- Cabina de Flujo Laminar tipo IIA, para seguridad biológica.
- Todo el personal involucrado en la obtención de muestras, fue vacunado contra la Influenza, acorde a las recomendaciones de la Organización Mundial de la Salud (OMS).
- Acceso restringido a laboratorios.

## **RESULTADOS**

De un total de 928 muestras, recolectadas entre Octubre de 2011 a Septiembre de 2012 en 7 sitios de muestreos a lo largo del país, fueron aisladas 46 cepas de *Salmonella spp.*, obteniéndose una frecuencia de presentación de un 4,95% (46/928). A su vez, el serovar con mayor incidencia en este estudio fue *S. Enteritidis*, con un 69,56% (32/46). *Salmonella* Heildeberg (4/46, 8,69%), obtuvo la segunda mayoría, seguida por *S. Seftenberg* (2/46, 4,34%); por último, se identificaron otros serovares en menores proporciones: *Salmonella* Anatum, Havana, Agona, Infantis, Dublin, y una cepa Grupo B (I 4, 5, 12:b:), los cuales, presentaron una frecuencia de 2,17% (1/46), cada uno (Tabla 3).

Por otra parte, y con respecto al segundo objetivo específico de este estudio, se describirán los resultados obtenidos al evaluar la presencia de los genes seleccionados en los serovares aislados.

### **Virulotipificación**

Antes de iniciar este análisis se confirmó mediante PCR simple, que todas las cepas correspondieran a *Salmonella enterica*, lo cual fue posible al identificar el gen *invA* en el 100% de las cepas aisladas en este estudio.

Se identificaron 12 combinaciones de genes asociados a virulencia o virulotipos, con una distribución variable entre serovares ( $p < 0.01$ ), las cuales se exponen en la Figura 1.

El gen *sirA*, no se encontró en ninguna cepa de *S. Enteritidis*, aunque sí en las cuatro cepas de *S. Heidelberg* y de *S. Senftenberg* y en todos los demás serovares aislados en este estudio, aunque en diferentes combinaciones con los demás genes de virulencia. En comparación al gen *spvC*, en donde fue posible su identificación en el 96,7% (30/31) de las cepas de *S. Enteritidis*. Más aún, el gen *prot6e*, fue identificado en casi todas las cepas (45/46, 97,8%) no importando el serotipo, sólo estuvo ausente en una cepa de *S. Senftenberg* de la región de Bío Bío.

En cuanto al gen *gipA*, se presentó en el aislado de *S. Dublin*, tres cepas de *S. Heidelberg* y una cepa de *S. Enteritidis*. Para el gen *trhH*, solamente se logró identificar en la única cepa aislada de *S. Havana*.

Por otra parte, el gen *SEN1417* se encontró en el 35,48% de las cepas de *S. Enteritidis* y en todos los demás serovares, excepto en tres cepas de *S. Senftenberg*.

Finalmente, el gen *pefA* se identificó en la mayoría de las cepas de *S. Enteritidis* tanto de Valparaíso como de Coquimbo, al igual que en los principales virulotipos (A y B), y en la cepa control SARB 16.

## DISCUSIÓN

Diversas especies de aves del género *Charadriiformes* (gaviotas y gaviotines), fueron las más representadas dentro del total de muestras obtenidas en este estudio, siendo la Gaviota Dominicana (*Larus dominicanus*), (538/928, 57,97%) la especie más frecuentemente encontrada. Esto se debe a la reconocida capacidad del género *Larus* para adaptarse a diversos ambientes, en los cuales se alimentan, reproducen y establecen su territorio (Frere *et al.*, 2000; López-Martín *et al.*, 2011). Debido a sus hábitos alimenticios oportunistas, es frecuente observarlas abasteciéndose desde fuentes antrópicas, como basurales urbanos y pesqueros, desagües, etc. (Frere *et al.*, 2000; López-Martín *et al.*, 2011). A raíz de esto, las gaviotas son consideradas como el grupo de aves silvestres con mayor potencial en la transmisión de patógenos, fundamentalmente de enterobacterias, hacia el hombre y el ganado (Frere *et al.*, 2000, Duarte *et al.*, 2002).

En este caso, la frecuencia de presentación de *Salmonella enterica*, fue de 4,95%, a diferencia de otras publicaciones como Duarte *et al.*, (2002) los cuales, utilizando la misma metodología de muestreo en gaviotas patas amarillas (*Larus cachinnans*) y dorsinegra menor o sombría (*Larus fuscus*) en cinco playas cercanas a la ciudad de Lisboa en Portugal, obtuvieron un 13% de positividad, siendo *S. Typhimurium* con un 37,8%, el serovar más aislado, seguido por *S. Derby* (18,9%).

Con respecto a lo anterior, Palmgren *et al.* (2006) reporta una prevalencia del 2,7% para *Salmonella* spp., luego de un estudio durante 3 años y la recolección de 1047 muestras fecales desde gaviotas de cabeza negra (*Larus rudibundus*) en Suecia. *Salmonella Typhimurium* fue el serovar más aislado con un 83%, siendo los tipos definitivos (DT) DT41 y DT195, los más prevalentes; en el caso de *S. Enteritidis* se obtuvo sólo en un 3,6% de los casos, a pesar de ser el segundo serovar más aislado en casos de salmonelosis en humanos en Suecia.

En otro estudio, publicado por Dolejská *et al.* (2009), se tomaron muestras de agua de un estanque cercano a Ostrava, ubicado al noroeste de República Checa; luego se muestreo una colonia de gaviotas cabeza negra (*Larus rudibundus*), la cual reside en ese lugar junto a más de 250 especies de aves. Se aisló *Salmonella* spp. en el 16% de las muestras de agua (n=87) y en un 24% de las gaviotas (n= 216). *S. Enteritidis* fagotipo (PT) PT8 y PT4 fueron los más prevalentes. Cabe destacar, que el PT8 es el más prevalente tanto en animales como en personas en ese país. Además, se evidenció resistencia a uno o más antibióticos en el 29% de los aislados de *Salmonella* spp. desde las gaviotas.

En Latinoamérica existen escasos reportes con respecto a *Salmonella* spp. en aves silvestres, por lo que cabe destacar el estudio de Frere *et al.* (2000), quienes capturaron a cien ejemplares de Gaviota Dominicana en el basural pesquero de Puerto Deseado, Patagonia Austral, Argentina. Allí se encontraron diez tipos de enterobacterias, entre ellas, *Escherichia coli* (96%) como la principal y *S. Typhimurium* con un 4% de incidencia, además de ser el único serovar encontrado para *S. enterica*. A esto se complementa el estudio realizado por Giaccardi *et al.* (1997), quienes estudiaron el comportamiento de esta gaviota en un basural en la ciudad de Rawson, Chubut, Argentina, el cual recibe residuos de origen doméstico, descarte pesquero y aguas servidas. Sus conclusiones apuntan, a que este basural era fundamental como recurso alimenticio para estas aves, encontrando ejemplares de todas las edades y no importando la época del año, sino el estado de los residuos aquí depositados o la disponibilidad inmediata de éstos.

Así también, Butron y Brightsmith (2010) realizaron un muestreo entre los años 2004-2005 en la Reserva Nacional Tambopata en la amazonía peruana, con el objetivo de aislar *Salmonella* spp. mediante tórula cloacal y cultivo bacteriano, desde diversas especies de loros decomisados y liberados en este lugar, loros silvestres y aves domésticas acuáticas que habitan los alrededores de esta reserva. Los resultados que obtuvieron, fueron comparados con una investigación realizada en los años 1992-1993, en donde se encontró positividad mediante serología a *S. Pullorum* en Guacamayos (*Aras* spp.) que fueron liberados en este mismo lugar. En esta nueva investigación, todos los ejemplares de loros resultaron negativos, no así las aves domésticas acuáticas, logrando un 31% de positividad a *Salmonella* spp; los investigadores plantearon por lo tanto, el riesgo de transmisión de patógenos para las poblaciones de aves silvestres en esta reserva desde las aves acuáticas, cuestión que también plantea Deem *et al.* (2005), al encontrar serología positiva a *S. Pullorum* en Amazonas de frente azul (*Amazonas aestiva*) en Bolivia.

En nuestro país, López-Martín *et al.* (2011) obtuvieron un 25% de aislamiento para *Salmonella* spp., en gaviotas Dominicanas (*L. dominicanus*) y un 6,7% en Gaviota de Franklin (*Leucophaeus pipixcan*). Identificando a *S. Enteritidis* y *S. Senftenberg* en ambas especies de gaviotas, mientras que *S. Anatum* y *S. Infantis* fueron encontrados solamente en las primeras gaviotas mencionadas. Existen sin embargo, diferencias en la metodología de muestreo utilizada en comparación con la presente investigación, lo que podría ser la causa de estos resultados tan disímiles. López-Martín *et al.* (2011) capturaron sesenta gaviotas de Franklin, obteniendo las heces mediante tórula cloacal, mientras que 123 ejemplares de gaviota

Dominicana, fueron sacrificados recolectando diversas muestras durante la necropsia (tórula traqueal, sección de intestino, hígado, bazo, riñón y pulmón, heces desde cloaca y lavado de patas), lo cual aumenta considerablemente la posibilidad de aislamiento bacteriano. En una posterior publicación del grupo de investigadores, Rodríguez, *et al.* (2012) obtuvieron resultados similares, aunque la técnica utilizada fue PCR tiempo real, lo que aumentó notablemente la sensibilidad de los resultados.

En nuestro estudio, cabe destacar la gran cantidad de aislados positivos en las regiones de Valparaíso y Coquimbo. Las características ambientales para las principales caletas de pescadores en las regiones mencionadas, son bastante similares, ya que el lugar de desembarque de los botes se encuentra contiguo a los locales de expendio de mariscos y pescados, además de presentar un flujo constante de personas (pescadores y turistas), perros, gatos y diversas aves, principalmente Gaviotas Dominicanas (*Larus dominicanus*) y Pelícanos (*Pelecanus thagus*), entre otras como, Gaviota Garuma (*Leucophaeus modestus*), Cormorán Yeco (*Phalacrocorax brasilianus*), Tiuque (*Milvago chimango*), Garza chica (*Egretta thula*), Huairavo (*Nycticorax nycticorax*), etc. Además, las muestras fueron recolectadas en ambos lugares desde un mirador abierto al público, en donde gran cantidad de aves se posan y defecan continuamente.

*Salmonella* Agona, uno de los serovares que fue aislado durante los meses de invierno y en un solo sitio de muestreo, merece un análisis más detallado. Nesse *et al.* (2005), analizaron 27 aislados de *S. Agona*, 42 de *S. Montevideo* y 29 de *S. Senftenberg* provenientes de diversas fuentes en Noruega: una colonia de gaviotas mayores de dorso negro (*Larus marinus*) y gaviotas argénteas (*Larus argentatus*), fábricas de harina de pescado, fábricas de forraje en fardos, animales domésticos y humanos, mediante electroforesis de campos pulsados (PFGE). Los resultados demostraron que dos de las cepas de *S. Agona* (A1 y A2) fueron identificadas tanto en gaviotas como en una de las fábricas de forraje en fardos y en una fábrica de harina de pescado. Más aún, A2 fue encontrada en dos granjas avícolas. Además otra cepa de *S. Agona* aislada desde una gaviota, obtuvo más de un 90% de similitud con A1. Sin embargo, las cepas de este mismo serovar aisladas en humanos, fueron diferentes a todas las otras cepas. Por lo que es posible pensar, que si bien la cepa de *S. Agona* aislada en este estudio, proviene de una gaviota, las vías de infección son múltiples y este aislamiento podría demostrar el cambio sustancial en las fuentes de alimentación para estas aves marinas en un período del año, en el que la pesca y el flujo de personas disminuye considerablemente.

En la misma región en la caleta de pescadores de San Antonio, se obtuvieron tres cepas, *S. Infantis*, *S. Dublin* y *S. Senftenberg*, todos provenientes de gaviotas Dominicanas. Uno de los hallazgos más importantes de este trabajo, fue identificar a *S. Dublin*, ya que es un serovar adaptado a los bovinos (Dietz *et al.*, 2006). Es capaz de infectar tanto a animales jóvenes como a adultos, causando enteritis y enfermedad sistémica, generando en algunos casos una alta mortalidad. Además, la infección presenta una tendencia marcada a persistir en el tiempo, dejando portadores con una excreción continua o intermitente de *Salmonella* en las heces (Dietz *et al.*, 2006). Si ocurre infección en las personas, la bacteria suele llegar a ser más invasiva que otros serovares (Dietz *et al.*, 2006). De acuerdo a la literatura recopilada para la realización de esta memoria, no existen reportes de *S. Dublin* en gaviotas, ni tampoco en otras aves silvestres a nivel nacional y no fue posible encontrar evidencias de aislamiento en aves de corral. Sólo destacar el brote producido por este serovar en criaderos de visones en Dinamarca en el año 2000, descrito por Dietz *et al.* (2006) en donde se produjo una muerte masiva de animales adultos al igual que abortos. Por lo que, el rol de este serovar en animales silvestres no se conoce con claridad.

Por otra parte, fue posible muestrear cuatro humedales, sitios muy importantes para la conservación de aves residentes y migratorias en nuestro país, donde confluyen grandes cantidades de ejemplares cada año, estableciéndose un contacto estrecho entre diversas especies y por lo tanto, la oportunidad de transmisión y diseminación de patógenos.

Durante el invierno de 2012, fue posible muestrear una gran bandada de Piuquenes (*Chloephaga melanoptera*) en el Humedal de Batuco, RM, del cual se obtuvo una cepa de *S. Heidelberg*. Este lugar se conoce por albergar a diversas especies de patos silvestres, Perritos (*Himantopus mexicanus melanurus*) y Taguas (*Fulica* spp.), sin embargo, también tienen acceso campesinos con ganado vacuno y rebaños de cabras, los cuales alimentan a sus animales en el mismo sector que habitan las aves. Es probable que estas aves al ser totalmente herbívoras y se alimenten en el mismo sector que los animales domésticos hayan contraído la infección por esta vía. No se conocen otros estudios en esta especie de ave, por lo que este hallazgo resulta ser muy interesante, más aún por la situación epidemiológica del humedal en cuestión.

En la Región de Valparaíso, fue posible visitar en diversas oportunidades la desembocadura del río Maipo, durante los meses de Diciembre de 2011 y Enero 2012 y a pesar de obtener gran cantidad de muestras en cada ocasión, sólo se obtuvieron dos aislados positivos, una cepa de

*S. Senftenberg* y una cepa de *S. Grupo B* (I 4,5,12:b:-). En esta oportunidad, no se pudo determinar la especie de ave a la cual corresponden estos aislados, ya que allí se congregan gran cantidad de aves marinas migratorias, entre ellas la Gaviota de Franklin (*Leucophaeus pipixcan*), Gaviotín elegante (*Thalasseus elegans*), Gaviotín sudamericano (*Sterna hirundinacea*), Playero blanco (*Calidris alba*) etc. Además, se observa con frecuencia ganado vacuno y ocasionalmente caballos, además de ser un destino habitual para turistas, lo que ofrece una diversidad de posibilidades de infección para estas aves y viceversa.

La detección de *S. Enteritidis* en la mayoría de los lugares de muestreo, abre un espacio de discusión frente al rol que estarían presentando las aves silvestres acuáticas en la epidemiología de *Salmonella* spp., en nuestro país, ya que el componente silvestre en los ciclos de transmisión de patógenos, generalmente no se incluye en los análisis. Los hallazgos del presente trabajo resultan relevantes, ya que se debe considerar a la gaviota Dominicana (*Larus dominicanus*) como un reservorio silvestre importante para *S. enterica* a lo largo de la costa, pudiendo participar activamente en la transmisión de la bacteria hacia fuentes de agua, alimentos de consumo en ferias o pescaderías, aves migratorias, animales domésticos y directamente al ser humano

Por otro lado, la identificación de genes asociados a virulencia en serovares de *S. enterica* aislados desde aves silvestres, existen escasos estudios, por lo cual la frecuencia de presentación se comparó con los resultados publicados por Huehn *et al.* (2010), en donde se establecen las prevalencias de estos genes con respecto a *S. Enteritidis*.

Por un lado, el gen *sirA*, no se encontró en ninguna cepa de *S. Enteritidis*, aunque sí estuvo presente en la mayoría de los otros serovares, lo que contrasta con Huehn *et al.* (2010), ya que la prevalencia del gen *sirA* en *S. Enteritidis* fue de 41,2%, aunque en ese caso el origen de la muestra era el ser humano.

Con respecto al gen *spvC*, los resultados se asemejan a lo expuesto por Huehn *et al.* (2010), ya que encontraron este gen en algunas cepas de *S. Enteritidis* y *S. Typhimurium*.

En cuanto al gen *gipA*, Huehn *et al.* (2010) describen una baja prevalencia (8,9%), lo cual es similar a nuestro estudio, ya que se identificó en una sola cepa de *S. Enteritidis*, aunque también en otros serovares. Los investigadores reportan a este gen con una mayor frecuencia en *S. Typhimurium*, debido a que se encuentra inserto en el bacteriófago denominado Gifsy-1, siendo utilizado el producto de éste, como parte de los mecanismos de sobrevivencia en las Placas de Peyer (Flanigan y Gardner, 2007).

Para el gen *trhH*, Huehn *et al.* (2010) mencionan su presencia de forma ocasional en algunas cepas de *S. Enteritidis* y en *S. Typhimurium*, lo cual no se observó en el caso de las cepas de *S. Enteritidis*, a pesar de que sí se identificó en otros serovares; por lo que se debe seguir investigando al respecto.

Por otra parte, Pan *et al.* (2009), describen la presencia del gen *SEN1417* (transportador putativo de aminoácidos), en fagotipos prevalentes de *S. Enteritidis*, *S. Typhimurium*, *S. Typhi*, entre otros, por lo que sería requerido sin duda en el proceso infeccioso. En este caso, al no realizar una fagotipificación, no fue posible correlacionar estos datos, aunque se identificó en el 35,48% de las cepas de *S. Enteritidis*.

Ahora, al analizar el árbol filogenético se observa una agrupación diferencial entre *S. Enteritidis* y cepas de *S. Heidelberg*, lo cual se explicaría por la diversidad en las funciones de patogenicidad y repertorio genético presente entre serotipos (Figura 1). Al analizar este aspecto entre el resto de los serovares aislados, no se evidenció una discriminación clara entre ellos, causado probablemente por la escasez de cepas de cada uno y por el criterio basado en *S. Enteritidis* para la selección de genes específicos. La mayoría de las cepas se agruparon en 2 virulotipos (A y B) dentro de *S. Enteritidis*, observándose asociación geográfica ( $p < 0,01$ ) para las Regiones de Valparaíso y Coquimbo, respectivamente (Figura 1), lo que sugiere una distribución heterogénea de las cepas de *S. Enteritidis* a lo largo de la costa chilena.

En Chile, *S. enterica* es una bacteria endémica que produce infecciones en humanos y animales domésticos. Los resultados del presente estudio demostraron que seis de los 20 serovares más frecuentemente aislados en seres humanos en la región (Hendriksen, *et al.* 2011) fueron detectados en aves silvestres (*Enteritidis*, *Agona*, *Infantis*, *Dublin*, *Anatum* y *Heidelberg*).

Se necesita una mayor investigación y seguimiento de la infección por *Salmonella* en las aves silvestres con el fin de caracterizar las cepas emergentes, los ciclos de transmisión y fluctuaciones temporo-espaciales debido a los cambios climáticos globales, con el objetivo de reducir los riesgos potenciales para la salud pública, los animales domésticos y la vida silvestre.

## REFERENCIAS

- **ANDREWS-POLYMENIS H.; SANTIVIAGO C.; McCLEALLAND M.** 2009. Novel genetic tools for studying food-borne *Salmonella*. *Current Opinion in Biotechnology*. 20: 149-157.
- **BUTRON, O.; BRIGHTSMITH, D.** 2010. Testing for *Salmonella spp.* In released parrots, wild parrots and domestic fowl in lowland Peru. *Journal of Wildlife Diseases* 46 (3): 718-723.
- **COMISIÓN NACIONAL DE INVESTIGACIÓN CIENTÍFICA Y TECNOLÓGICA (CONICYT).** 2008. Manual de Normas de Bioseguridad. Segunda Edición. Santiago, Chile. 139 p.
- **DEEM, S; NOSS, A; CUÉLLAR, R.; KARESH, W.** 2005. Health evaluation of free-ranging and captive blue-fronted Amazon parrots (*Amazona aestiva*) in the Gran chaco, Bolivia. *Journal of Zoo and Wildlife Medicine*; 36(4): 598-605.
- **DHAMA, K., MAHENDRAN, M.; TOMAR, S.** 2008. Pathogens Transmitted by Migratory Birds: Threat Perceptions to Poultry Health and Production. *International Journal of Poultry Science* 7 (6): 516-525.
- **DIETZ, H.; CHRIÉL, M.; ANDERSEN, T.; JORGENSEN, J.; TORPDAHL, M.; PEDERSEN, H.; PEDERSEN, K.** 2006. Outbreak of *Salmonella* Dublin-associated abortion in Danish fur farms. *Can Vet J*; 47: 1201-1205.
- **DOLEJSKÁ, M.; BIEROSOVÁ, B.; KOHOUTOVÁ, L.; LITERÁK, I.; CÍZEK, A.** 2009. Antibiotic-resistant *Salmonella* and *Escherichia coli* isolates with integrons and extended-spectrum beta-lactamases in surface water and sympatric black-headed gulls. *Applied Microbiology* 106, 1941-1950.
- **DUARTE, E.; GUERRA, M.; BERNARDO, F.** 2002. *Salmonella* and *Listeria spp.* Carriage by gulls (larids). *Revista Portuguesa de Ciencias Veterinarias* 97 (544) 181-187.
- **FICA, A.; ACOSTA, G.; DABANCH, J.; PERRET, C.; TORRES, M.; LÓPEZ, J.; JOFRÉ, L.; WEITZEL, T.** 2012. Brotes de salmonelosis y el tamaño y rol del Estado en Chile. *Revista Chilena Infectología* 29 (2): 207-214.
- **FLANIGAN, A.; GARDNER, J.** 2007. Interaction of the Gifsy-1 Xis Protein with the Gifsy-1 attP Sequence. *Journal of Bacteriology*.
- **FRERE, E.; GANDINI, P.; MARTÍNEZ, P.** 2000. Gaviota Cocinera (*Larus dominicanus*) como vector potencial de patógenos, en la costa patagónica. *Hornero* 015 (02): 093-097.
- **GIACCARDI, M.; YORIO, P.; LIZURUME, M.** 1997. Patrones estacionales de abundancia de la gaviota cocinera (*Larus dominicanus*) en un basural patagónico y sus relaciones con el manejo de residuos urbanos y pesqueros. *Ornitología Neotropical* 8: 77-84.
- **HENDRIKSEN, R.; VIEIRA, A.; KARLSMOSE, S.; LO FO WONG, D.; JENSEN, A.; WEGENER, H.; AARESTRUP, F.** 2011. Global Monitoring of *Salmonella* Serovar Distribution from the World Health Organization Global Foodborne Infections Network Country Data Base: Results of Quality Assured Laboratories from 2001 to 2007. *Foodborne Pathogens and Disease*. 8(8): 887-900.
- **HOELZER, K.; MORENO, A.; WIEDMANN, M.** 2011. Animal contact as source of human non-typhoidal salmonellosis. *Veterinary Research*. 42(1): 34.

- **HUBÁLEK, Z.** 2004. An annotated checklist of pathogenic microorganisms associated with migratory birds. *Journal of Wildlife Diseases*. 40 (4): 639-659.
- **HUEHN, S.; LA RAGIONE, R.; ANJUM, M.; SAUNDERS, M; WOODWARD, M.; BUNGE, C.; HELMUTH, R.; HAUSER, E.; GUERRA, B.; BEUTLICH, J.; BRISABOIS, A.; PETERS, T.; SVENSSON, L.; MADAJCZAK, G.; LITRUP, E; IMRE, A.; HERRERA, S.; MEVIUS, D.; NEWELL, D.; MALORNY, B.** 2010. Virulotyping and antimicrobial resistance typing of *Salmonella enterica* serovars relevant to human health in europe. *Foodborne pathogens and disease*. 7(5): 523-535.
- **HUGHES, L.; SHOPLAND, S.; WIGLEY, P.; BRADON, H.; LEATHERBARROW, H.; WILLIAMS, N.; BENNETT, M.; DE PINA, E.; LAWSON, B.; CUNNINGHAM, A.; CHANTREY, J.** 2008. Characterisation of *Salmonella enterica* serotype Typhimurium isolates from wild birds in northern England from 2005-2006. *BMC Veterinary Research*. 4: 4.
- **INSTITUTO DE SALUD PÚBLICA (ISP).** 2012. Vigilancia de *Salmonella spp.* Chile, 2008 – 2011. *Boletín ISP*. 2: 13.
- **JENSEN A.; SORENSEN G.; BAGGENSEN D.; BODKER R.; HOORFAR J.** 2003. Addition of Novobiocin in pre-enrichment step can improve *Salmonella* culture protocol of modified semisolid Rappaport-Vassiliadis. *Journal of Microbiological Methods*. 55: 249-255.
- **KOBAYASHI, H.; KANAZAKI, M.; SHIMIZU, Y.; NAKAJIMA, H.; KHATUN, M.; HATA, E.; KUBO, M.** 2007. *Salmonella* Isolates from Cloacal Swabs and Footpads of Wild Birds in the Immediate Environment of Tokyo Bay. *Journal of Veterinary Medical Science*. 69 (3): 309-311.
- **LÓPEZ-MARTÍN, J.; JUNOD, T.; RIQUELME, F.; CONTRERAS, C.; GONZÁLEZ-ACUÑA, D.** 2011. Detección de especies de *Salmonella* y *Mycobacterium* en gaviotas dominicanas (*Larus dominicanus*) y gaviotas de Franklin (*Leucophaeus pipixcan*) en la ciudad de Talcahuano, Chile. *Revista Médica de Chile*. 139: 1496-1502.
- **MAJOWICZ, S.; MUSTO, J.; SCALLAN E.; ANGULO, F.; KIRK, M.; O'BRIEN, S.; JONES, T.; FAZIL, A.; HOEKSTRA, R.** 2010. The global burden of nontyphoidal *Salmonella* gastroenteritis. *Clinical Infectious Diseases*. 50(6): 882–889.
- **MONACK, D.** 2012. *Salmonella* persistence and transmission strategies. *Current Opinion in Microbiology*. 15: 100-107.
- **NESSE, L.; REFSUM, T.; HEIR, E.; NORDBY, K.; VARDUND, T.** 2005. Molecular epidemiology of *Salmonella spp.* isolates from gulls, fish-meal factories, feed factories, animals and humans in Norway base on pulsed-field gel electrophoresis. *Epidemiology and Infection* 133, 53-58.
- **ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE SANIDAD ANIMAL (OIE).** 2008. Manual de Test Diagnósticos y Vacunas para los Animales Terrestres. [en línea] <[http://www.oie.int/eng/normes/mmanual/A\\_summry.htm](http://www.oie.int/eng/normes/mmanual/A_summry.htm)> [consulta 06-06-12].
- **PAN, Z.; CARTER, B.; NÚÑEZ-GARCÍA, J.; ABUOUN, M.; FOOKES, M.; IVENS, A.; WOODWARD, M.; ANJUM, M.** 2009. Identification of genetic and phenotypic differences associated with prevalent and non-prevalent *Salmonella* Enteritidis phage types: analysis of variation in amino acid transport. *Microbiology*. 155: 3200–3213.

- **PALMGREN H; ASPÁN A.; BROMAN T.; BENGTSSON K.; BLOMQUIST L.; BERGSTROM S.; SELLIN M; WOLLIN R.; OLSEN B. 2006.** Salmonella in Black-headed gulls (*Larus ridibundus*); prevalence, genotypes and influence on Salmonella epidemiology. *Epidemiology and Infection* 134, 635-644.
- **PEDERSEN T.; OLSEN J.; BISGAARD M. 2008.** Persistence of Salmonella Senftenberg in poultry production environments and investigation of its resistance to desiccation. *Avian Pathology* 37 (4), 421-427.
- **PUI, C; WONG, W.; CHAI, L.; TUNUNG, R.; JEYALETCHUMI, P.; NOOR, M.; UBONG, A. FARINAZLEEN, M.; CHEAH, Y.; SON, R. 2011.** *Salmonella*: A foodborne pathogen. *International Food Research Journal*. 18: 465-473.
- **RODRIGUEZ, F.; MORENO, J.; ORTEGA, R.; MATHIEU, C.; GARCIA, A.; CERDA-LEAL, F.; GONZALEZ-ACUNA, D.; 2012.** Evidence for Kelp Gulls (*Larus dominicanus*) and Franklin's Gulls (*Leucophaeus pipixcan*) as Carriers of *Salmonella* by Real-time Polymerase Chain Reaction. *Journal of Wildlife Diseases* 48, 1105-1108.
- **TSIODRAS, S.; KELESIDIS, T.; KELESIDIS, L.; BAUCHINGER, U.; FALAGAS, M. 2008.** Human infections associated with wild birds. *Journal of Infection*. 56: 83-98.
- **ZOU, M.; KEELARA S.; THAKUR S. 2012.** Molecular Characterization of *Salmonella enterica* Serotype Enteritidis Isolates from Humans by Antimicrobial Resistance, Virulence Genes, and Pulsed-Field Gel Electrophoresis. *Foodborne Pathogens and Disease*. Vol 9, Number 3.

## ANEXOS

**Tabla 1.** Genes asociados a virulencia, partidores y características de su función particular.

Gen	Localización	Función	Prevalencia (%)	Partidores	Producto (pb)	T <sub>m</sub> (°C)
<i>gipA</i>	Profago Gifsy-1	Factor de virulencia específico de Placas de Peyer.	8,9	acgactgagcaggctgag	518	48
				ttgaaatggtgacgtagac		51,5
<i>spvC</i>	Plásmido pSLT	Región spv promotora de un rápido crecimiento y la supervivencia en el hospedero.	84,9	ctccttgacaaccaaagcg	570	57,8
				tgtctctgcattcaccaccatc		56,3
<i>trhH</i>	Isla genómica de <i>Salmonella</i> I	Proteína ensambladora del pili, hipotética	10,5	aactggtgccgtgtcattg	418	53,2
				gatggtctgtgcttgctgag		50,4
<i>sirA</i>	Islote	Sistema de dos componentes con barA	42,1	tgcgcctggtgacaaaactg	313	56,9
				actgactcccaggctacagca		55,4
<i>prot6e</i>	Plásmido pSLT	Fimbria	89,4	gcctaaggtagtgactctc	579	46,9
				ctagcagccggttgatcc		49,8
<i>pefA</i>	Plásmido pSLT	Fimbria	89,4	cctgtgacctgaccacttctg	418	51,8
				gtaagccactgcgaaagatg		50,1
** <i>invA</i>	Cromosoma	Proteína exportadora del complejo aguja	100	gtgaaattatgccacgttcgggcaa	284	66,8
				tcatcgaccgtcaaaggaacc		60,6
*** <i>sen1417</i>	Cromosoma	Transportador putativo de aminoácidos	Cepas prevalentes	gatcgctggctggtc	670	43
				ctgaccgtaatggcga		44

(Huenh *et al.*, 2010), \*\* (Malorny, 2003), \*\*\* (Pan, 2009).

**Tabla 2.** Condiciones de amplificación para PCR.

T° (°C)	Tiempo	N° Ciclos
94	5 min	1
94	45 seg	35
53-56*	45 seg	
72	1.5 min	
72	10 min	1

\*53°C para *trhH* y *prot6e*; 56°C para *invA*, *spvC*, *pefA*, *SEN1417* y *sirA*.

**Tabla 3.** Identificación del sitio de muestreo, hospedero y serovares aislados.

<b>Sitio de muestreo</b>	<b>Hospedero (Número de muestras)</b>	<b>Identificación de cepas</b>
Arica 18°24'S 70°19'W 18°26'S 70°18'W	<i>Leucophaeus pipixcan</i> <i>Larus dominicanus</i> <i>Leucophaeus modestus</i>	S. Enteritidis 95 S. Anatum 1 S. Havana 2
Coquimbo 29°57'S 71°20'W	<i>Larus dominicanus</i>	S. Enteritidis 97 S. Enteritidis 98 S. Enteritidis 99 S. Enteritidis 100 S. Enteritidis 101 S. Enteritidis 102 S. Enteritidis 103 S. Enteritidis 104 S. Enteritidis 105 S. Enteritidis 106 S. Enteritidis 107
Valparaíso 33°01'S 71°35'W	<i>Larus dominicanus</i>	S. Enteritidis 108 S. Enteritidis 109 S. Enteritidis 110 S. Enteritidis 111 S. Enteritidis 112 S. Enteritidis 113 S. Enteritidis 114 S. Enteritidis 115 S. Enteritidis 116 S. Enteritidis 117 S. Enteritidis 118 S. Enteritidis 119 S. Enteritidis 120 S. Enteritidis 121 S. Enteritidis 122 S. Enteritidis 123 S. Enteritidis 124 S. Enteritidis 125 S. Enteritidis 126 S. Enteritidis 127 S. Heidelberg 1 S. Heidelberg 2 S. Heidelberg 3 S. Agona 2
33°34'S 71°36'W	<i>Larus dominicanus</i>	S. Infantis 3 S. Senftenberg 3 S. Dublin 1
33°37'S 71°37'W	<i>Larus dominicanus</i>	S. Senftenberg 2 S. <i>enterica</i> Group B <sup>b</sup>
Metropolitana 33°12'S 70°49'W	<i>Chloephaga melanoptera</i>	S. Heidelberg 4
Bío Bío 36°42'S 73°6'W	<i>Larus dominicanus</i>	S. Senftenberg 6 S. Senftenberg 7



